

Studies on in vivo targeting system of small interfering RNA mediated by liposome carrier

著者	園家 暁
内容記述	Thesis (Ph. D.)--University of Tsukuba, (A), no. 6492, 2013.3.25 Includes bibliographical references (leaves 43-49)
発行年	2013
URL	http://hdl.handle.net/2241/120193

氏 名 (本籍)	その 園 家	さとる 暁 (京 都 府)
学 位 の 種 類	博 士 (学 術)	
学 位 記 番 号	博 甲 第 6492 号	
学位授与年月日	平成 25 年 3 月 25 日	
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当	
審 査 研 究 科	生命環境科学研究科	
学 位 論 文 題 目	Studies on <i>in vivo</i> Targeting System of Small Interfering RNA Mediated by Liposome Carrier (リポソーム担体を用いた Small Interfering RNA の体内標的システムに関する研究)	
主 査	筑波大学准教授	理学博士 坂 本 和 一
副 査	筑波大学教授	理学博士 漆 原 秀 子
副 査	筑波大学教授	博士 (医学) 千 葉 智 樹
副 査	筑波大学教授	農学博士 宮 崎 均

論 文 の 内 容 の 要 旨

昨今、siRNA を医薬品として臨床応用する試みが世界的に広がりつつある。siRNA は、化学合成が可能であることと、従来のアンチセンス薬の作用の弱さや抗体薬の標的分子の少なさを克服できるという優れた特徴をもつ。しかしながら、siRNA 単独では標的細胞における安定性や持続性など作用が限定的であり、解決すべき問題も多い。これは、生体内における siRNA の分解、尿中への速やかな排泄、細胞膜の非透過性などが原因とされている。現在、リポソームや高分子あるいはウイルスなどの担体を用いて siRNA を安定的かつ持続的に標的臓器に輸送し、選択的に標的細胞内へ導入させる試みが様々な形で実施されている。

本研究は、組織特異的リポソーム担体を開発し、標的細胞である肝臓細胞と腫瘍細胞に siRNA を効率的に導入し、RNAi の安定性や作用の有効性を科学的に評価解析することを目的とした。

まず、PEG で被覆したリポソームについて、血漿中濃度の検討を行った。各種リン脂質（アシル基が C12 ～ C18 および不飽和型 C18 : 1）の極性部位に PEG を結合させてからカチオン性リポソーム（LIC）に配合したところ、siRNA の血漿中濃度が向上した。次に、血漿中濃度推移を評価したところ、アシル基の炭素数が 17、18 の担体では高く推移し AUC で対照の約 4 倍となった。この C18（PEG-LIC）は、皮下担がんモデルマウスにおいて PEG 脂質を含有しない LIC に比べて腫瘍内濃度が約 2.5 倍となり、腫瘍細胞に効率的に蓄積することが確認された。次に PEG-LIC の抗腫瘍効果を調べたところ、皮下移植モデルマウスの実験系において、PEG-LIC は用量依存的にがん結節の増大を抑制した。また、腹腔播種モデルマウスにおいても生存日数延長効果が確認され、腫瘍移行性を高めた PEG-LIC の有効性が確かめられた。さらに、腫瘍部位の In situ Hybridization により標的の *bcl-2* の発現抑制活性が認められたことから、PEG-LIC が生体内の腫瘍細胞内に効率的に導入され、*bcl-2* 発現を抑制することで抗腫瘍効果を発揮すると考えられた。

次に、リポソームの肝臓移行能を向上させる検討を行った。肝細胞のアシアロ糖タンパク受容体に認識されるガラクトースをリポソームに付加し（GDOPE）、カチオン性脂質との含有比率を変えた LIC-G1 ～ G5 を作製した後、siRNA との複合体を形成させた。ヒト肝癌細胞株（Huh-7 細胞）への移行性を解析したところ、

GDOPE の含有比率を高めると LIC-G1 ～ G5 の移行量が増加した。次に、hVEGF に対する siRNA を用いて RNAi 活性を検討したところ、取り込み量と相関して GDOPE 含有比率に依存して増強された。次に、生体での肝臓への移行性を確認したところ、LIC-G5 のマウス静脈内投与後の肝臓中 siLuc の分布率は、GDOPE を含有しない対照と比較して 1.7 倍高かった。同様にコラゲナーゼ肝灌流法により分離した肝実質細胞への取り込みは 1.9 倍であった。従って、LIC-G5 は、リボソーム表面に配位させたガラクトース分子の効果により、siRNA の肝細胞内への取り込みを促進し作用を増強させると考えられた。

本研究により、リボソームを PEG で被覆することにより、血中滞留効果や腫瘍内移行効率が高く、しかも強い抗腫瘍効果を示すリボソーム担体の開発と導入法の開発に成功した。また、ガラクトースをリボソームに付加した担体を用いることにより、肝細胞特異的に siRNA の導入効率を高めることが明らかになった。本研究成果は、肝臓細胞や腫瘍細胞に選択的かつ効果的に siRNA の導入を可能にする担体やその方法を明らかにしたもので、核酸医薬品としての siRNA の臨床応用への道を大きく切り開いた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、リボソーム担体を用いたより効果的な siRNA の体内標的システムに関する解析を行ったもので、特に、(1) PEG 結合脂質をもつ新規リボソームを用いた効果的な核酸導入法を開発し、さらに (2) ガラクトース結合型リボソームを用いた細胞特異的な核酸導入法を開発を行った。細胞特異性が高く効率的な核酸導入法の開発は、核酸医薬品の新規開発と臨床応用にとって必要不可欠な重要事項である。

本研究成果は、癌、脂質代謝疾患、ウイルス疾患、血液凝固異常など多くの疾患に対する核酸医薬の臨床応用への道を開拓し、将来に渡る広範な核酸医薬品の新規開発を可能にしたもので、その功績は極めて大きく社会的にも重要な意義をもつと言える。

平成 25 年 2 月 4 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（学術）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。